



UnB

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA**

THAYNARA STEFANYA BORGES DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA IN VITRO DE ÓLEO
ESSENCIAL DE ALECRIM DO CAMPO (*Baccharis dracunculifolia*)**

**BRASÍLIA, DF
2018**

THAYNARA STEFANYA BORGES DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA IN VITRO DE ÓLEO
ESSENCIAL DE ALECRIM DO CAMPO (*Baccharis dracunculifolia*)**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada
como requisito parcial para obtenção do grau de
Farmacêutico, na Universidade de Brasília,
Faculdade de Ceilândia.

Orientador: Profa. Dra. Danielle Kaiser de Souza

Co-orientador: Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva

BRASÍLIA, DF

2018

Ficha catalográfica elaborada automaticamente, com
os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

BS0729a Borges de Souza, Thaynara Stefanya
Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro de óleo
essencial de alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*) /
Thaynara Stefanya Borges de Souza; orientador Danielle
Kaiser de Souza; co-orientador Izabel Cristina Rodrigues
da Silva. -- Brasília, 2018.
37 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de
Brasília, 2018.

1. Alecrim-do-campo. 2. Óleos essenciais . 3. Novos
compostos antimicrobianos . 4. *Baccharis dracunculifolia*.
I. Kaiser de Souza, Danielle , orient. II. Rodrigues da
Silva, Izabel Cristina , co-orient. III. Título.

THAYNARA STEFANYA BORGES DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA IN VITRO DE ÓLEO
ESSENCIAL DE ALECRIM DO CAMPO (*Baccharis dracunculifolia*)**

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Profa. Dra. Danielle Kaiser de Souza
(FCE/ Universidade de Brasília)

Co-orientador: Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva
(FCE/ Universidade de Brasília)

Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi
(FCE/ Universidade de Brasília)

Prof. Dr. Daniel Oliveira Freire
(Faculdade LS)

BRASÍLIA, DF
2018

AGRADECIMENTOS

À Deus meus mais sinceros agradecimentos, por ter me permitido chegar até aqui, por ter me dado forças pra continuar quando eu mesma já não as tinha, por não ter me deixado desistir dessa jornada, mesmo sendo uma verdade para mim. Por ter me dado sabedoria para enfrentar as dificuldades do dia-a-dia e por não ter me desamparado nenhum dia sequer, em toda a graduação.

Agradeço à minha mãe, Consuelo, por cuidar de mim, me esperando retornar da faculdade todos os dias, me recebendo com carinho e atenção. Por ter suprido minhas necessidades sempre que eram necessárias. Obrigada por cada noite não dormida, por cada lágrima, por cada oração pela minha vida.

Às minhas irmãs, Thaís e Tatiane, agradeço por terem sido suporte sempre que precisei e preciso, por cada conselho, por toda torcida que fizeram para que eu chegasse até aqui. Muito obrigada por todos os momentos juntas, por serem minha companhia desde sempre, são à vocês quem recorro quando não vejo saídas.

Agradeço aos meus amigos, que estiveram comigo durante toda a graduação, Weverson, Jenyffer, Vítor Mariano, Cristina, compartilhando os bons e os maus momentos, porém meu agradecimento em especial é para Hellen, obrigada por ser essa amiga leal, por me motivar todos os dias, sempre enxergando o meu melhor e me dizendo palavras positivas, obrigada por não ter me deixado desistir nas inúmeras vezes que tentei, obrigada pela companhia de todos os dias e todo esforço que não mediu para me ajudar.

Agradeço aos meus familiares e amigos, por torcerem por mim e por entenderem todas as minhas ausências. Aos meus pastores por todas as orações.

Agradeço imensamente à brilhante Professora Izabel Cristina, por ter me acolhido e me ajudado com tanto empenho, sem ela esse trabalho não teria se concretizado. Obrigada pela ajuda, fazendo muitas vezes mais do que seu papel de docente. Agradeço à Professora Danielle Kaiser pela orientação. Agradeço à Professora Daniela Orsi, por toda disposição em me ajudar e pela rica contribuição para conclusão desde trabalho. Aos Professores Christopher William e Daniel Oliveira, pela contribuição. Sou grata a todos os mestres da graduação que contribuíram para minha formação como profissional.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. Alecrim-do-campo (<i>Baccharis dracunculifolia</i>)	13
2.2. Alecrim-do-campo e suas propriedades medicinais	13
2.3. Composição química dos extratos e do óleo essencial de <i>B. dracunculifolia</i>	15
2.4. A busca por novos compostos antimicrobianos	15
2.5. <i>Staphylococcus aureus</i>	17
2.6. <i>Escherichia coli</i>	17
3. JUSTIFICATIVA	19
4. OBJETIVOS	20
4.1. Objetivo geral	20
4.2. Objetivos específicos	20
5. METODOLOGIA	21
5.1. Produção do óleo essencial	21
5.2. Microrganismos avaliados	23
5.3. Determinação da Concentração Inibitória mínima (MIC) pelo Método de Microdiluição em Caldo	23
5.4. Viabilidade celular com Resazurina	24
5.5. Análise estatística	24
6. RESULTADOS	25
6.1. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>Baccharis dracunculifolia</i> pelo método de microdiluição em caldo	25
7. DISCUSSÃO	29
8. CONCLUSÃO	32
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. IC50, com intervalo de <i>confiança a 95% e IC 99.9 (MBC)</i> obtida após o método de microdiluição em caldo -----	26
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Arbusto de <i>Baccharis dracunculifolia</i> na Fazenda Água Limpa, UNB -----	21
Figura 2. Folhas de <i>B. dracunculifolia</i> limpas e dispostas para secagem -----	22
Figura 3. Processo de hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger -----	22
Figura 4. Método de microdiluição em caldo utilizando o óleo essencial de <i>Baccharis dracunculifolia</i> frente à bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> -----	25
Figura 5. Método de microdiluição em caldo utilizando o óleo essencial de <i>Baccharis dracunculifolia</i> frente à bactéria <i>Escherichia coli</i> -----	26

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. O efeito do extrato de *Baccharis dracunculifolia* resultam em diferentes CIMs: linha azul - *E. coli* e linha verde - *S. aureus* ----- 27

LISTA DE SIGLAS

MH - Mueller-Hinton

MRSA - *Methicillin Resistance Staphylococcus aureus*

CA-MRSA - *Community-associated MRSA*

FDA - *Food and Drug Administration*

FAL/UnB - Fazenda Água Limpa da Universidade de Brasília

INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

BHI - Brain Heart Infusion

CIM - Concentração Inibitória Mínima

IC95% - Intervalo de confiança a 95%

IC50 - 50% da concentração inibitória máxima

MBC - Concentração que resulta na morte bacteriana

RESUMO

O presente estudo tem como objetivo a avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* do óleo essencial de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*), extraído a partir das folhas secas da planta, frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. A biodiversidade do Cerrado desperta grande interesse em pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos antimicrobianos. O óleo essencial foi extraído através de hidrodestilação por aparelho de Clevenger, os testes de atividade antimicrobiana foram feitos por Microdiluição em Caldo, de acordo com a descrição da *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), e foi calculado a Concentração Inibitória Mínima (CIM). Os testes demonstraram inibição para as duas cepas testadas: obteve-se CIM de 0,020% para *Staphylococcus aureus* e de 0,025% para *Escherichia coli*. Com os resultados obtidos, o óleo mostrou-se eficiente em inibir o crescimento dos microrganismos que participaram dos experimentos, porém são válidas pesquisas futuras buscando caracterizar quimicamente o óleo estudado e verificar quais grupamentos químicos apresentam essa atividade. O aumento de resistência bacteriana registrado no ambiente hospitalar requer o estudo novos compostos antimicrobianos.

Palavras chaves: alecrim-do-campo; *Baccharis dracunculifolia*; óleo essencial; inibição; novos compostos antimicrobianos.

ABSTRACT

The present study aims to evaluate the antibacterial activity in vitro of the essential oil of rosemary's field (*Baccharis dracunculifolia*), extracted from the dry leaves of the plant, against the bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The Cerrado's biodiversity arouses a big interest in research and development of new antimicrobial drugs. The essential oil was extracted by hydrodistillation by Clevenger apparatus, the test of antimicrobial activity was performed by Microdilution in Broth, according to the description of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), and then the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was calculated. The tests demonstrated inhibition for the two tested strains: MIC of 0,020% for *Staphylococcus aureus* and 0,025% for *Escherichia coli*. In conclusion, the oil was efficient in inhibiting the growth of the tested microorganisms, however future researches to characterize chemically the oil is crucial to verify which chemical groups are responsible for the presented activity. The increase bacterial resistance currently registered in hospitals requires the study of new antimicrobial compounds.

Keywords: rosemary-field; *Baccharis dracunculifolia*; essential oil; inhibition; new antimicrobial compounds.

1. INTRODUÇÃO

As bactérias fazem parte da vida na terra e vivem em comensalismo com os seres humanos e animais. Fazem parte da microbiota dos indivíduos e muitas vezes tornam-se patogênicas, quando ocorre um desequilíbrio com o hospedeiro, ou seja, estão ligadas à vida dos organismos e também aos ambientes em que vivem. Sendo assim, quando entram em contato com antimicrobianos podem responder positiva ou negativamente àquela situação, logo, podem ser inibidas ou tornam-se resistentes ao fármaco (QUEIROZ, 2004).

As bactérias possuem capacidade de adaptação e o uso desenfreado de antimicrobianos aumenta a seleção natural dessas populações, pois uma vez expostas aos mesmos, facilita a adaptação ao ambiente, adquirindo resistência aos fármacos (QUEIROZ, 2004; PROBST, 2012).

Nos últimos anos foi registrado um elevado aumento de resistência bacteriana; bactérias que eram sensíveis aos fármacos usados na rotina clínica já não respondem à quase todos os antimicrobianos disponíveis. A dificuldade da resistência torna-se cada vez mais grave devido à complexidade em descobrir novos fármacos para o tratamento de infecções, pois a metodologia tradicional para essas descobertas vinha de produtos de fungos e bactérias, porém são matérias-primas cada vez mais caras e escassas (FERRONATTO *et al*, 2007).

A busca por novos fármacos antimicrobianos prioriza fontes vegetais, já que o Brasil possui vasta biodiversidade. Esses derivados representam possíveis fontes de tratamento. Os óleos essenciais possuem destaque pois a combinação com antibióticos pode potencializar a atividade dessas substâncias, uma vez que estudos vêm demonstrando potencial antimicrobiano em diversas espécies de plantas (TASCHETTO, 2010; GALVÃO, 2012; FERRONATTO *et al*, 2007).

A grande quantidade de espécies existentes no bioma Cerrado como fonte de possíveis substâncias, do ponto de vista químico e farmacológico, tem despertado grande interesse e desencadeado uma série de investimentos em pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos. Estudos químicos e de atividade biológica de extratos e metabólitos secundários isolados de espécies desse bioma têm apresentado várias atividades promissoras. Contudo, ainda há poucas informações a respeito da eficácia, segurança e padrões aceitáveis de segurança para a utilização dessas espécies como fonte de fitoterápicos.

Triagens *in vitro* permitiram descobrir uma maior especificidade dos fármacos, rapidez e eficiência dos métodos que em apenas quatro dias experimentais podem fornecer uma estimativa sobre um número elevado de óleos essenciais, extratos, princípios ativos e produtos de síntese. Posteriormente, as substâncias selecionadas são avaliadas em modelos experimentais *in vivo* ou *in situ*. Assim, a avaliação de novas espécies com potenciais aplicações na farmacoterapia pode ser realizada com maior precisão, possibilitando o desenvolvimento de medicamentos (MAISANABA *et al.*, 2015).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*)

A espécie *Baccharis dracunculifolia*, também conhecida como vassoura ou alecrim-do-campo, cresce em média 2 a 3 metros, se reproduz por sementes (aquênios), possui caules bastante ramificados e recobertos por tricomas. Ocorre principalmente no Cerrado brasileiro, está espalhada por toda a América do Sul e é comum em campos abertos, pastagens abandonadas e áreas de sucessão (SANTOS *et al.*, 2012; FERRONATTO *et al.*, 2007). Não é uma planta cultivada apesar de seu uso aromático e farmacológico; pelo contrário, essa espécie é muito combatida como invasora devido seu crescimento espontâneo, além de sofrer constante fragmentação do seu habitat (RIGOTTI, 2011).

O alecrim-do-campo é bastante usado na medicina caseira em forma de chás para os males do fígado e estômago, possuindo uma ação anti-inflamatória (RIGOTTI, 2011; VERDI *et al.*, 2005). É utilizada em preparações medicinais de uso popular com indicações para anemias, inflamações, diabetes, doenças na próstata, também conhecida por eliminar substâncias tóxicas do corpo (VERDI *et al.*, 2005), sabendo-se ainda que possui atividade contra fungos, bactérias e parasitas (BERNARDES, 2014). Sua composição tem sido estudada por diversos pesquisadores, observando a ocorrência de flavonas, flavonóis e de diterpenos labdanos e clerodanos (VERDI *et al.*, 2005; FERRONATTO *et al.*, 2007).

2.2. Alecrim-do-campo e suas propriedades medicinais

Apesar de muito combatida como invasora, a espécie têm sido amplamente estudada por sua contribuição para o desenvolvimento de novos fármacos, cosméticos e defensivos agrícolas, devido a composição química do óleo essencial (VERDI, 2005; PROBST, 2012) que depende da região geográfica em que foi cultivada e do processo de extração utilizado. O óleo essencial é considerado essência exótica, muito exportada como matéria-prima para confecção de perfumes, e sua importância comercial está diretamente relacionada com a concentração de compostos oxigenados, destacando o nerolidol e o espatulenol (SANTOS *et al.*, 2012; FERRONATTO *et al.*, 2007).

B. dracunculifolia é uma espécie muito atacada por insetos herbívoros e morfo-espécies, com isso a planta produz mecanismos de defesa química através de metabólitos secundários, sendo grande alvo de estudos em diversas áreas em busca de novas moléculas ativas (SANTOS *et al*, 2012; VERDI, 2005).

O uso popular da planta é feito através de infusão das folhas, usada como anti-inflamatória para o tratamento de doenças gastrintestinais, analgésica, para úlceras estomacais, para combater o cansaço físico, inapetência, febre, debilidade orgânica e desordens do fígado (CHAGAS, 2013; BELINI, 2015). A atividade anti-inflamatória intestinal do extrato de *B. dracunculifolia* está relacionada com a redução da atividade da enzima mieloperoxidase, redução nos níveis de TNF- α , aumento nos níveis da citosina anti-inflamatória IL-10 e por evitar o aumento da expressão relativa do gene da HSP70 (CHAGAS, 2013).

As análises de atividade biológica dessa planta mostram efeitos hipoglicemiantes, antioxidantes, antimicrobianos, antiparasitários (leishmanicida e esquistossomicida), citotóxicos, hipotensivos, imunoestimuladores e anti-inflamatórios. Além dessas propriedades os estudos mostram que o óleo essencial de alecrim-do-campo é ativo no tratamento de úlceras gástricas, atividade observada do composto *trans*-nerolidol (FERRONATTO *et al*, 2007; RIGOTTI, 2011; PROBST, 2012; FLORÃO, 2006).

No estudo de FERRONATTO *et al.* (2007), a capacidade antibacteriana do óleo essencial de *B. dracunculifolia* foi avaliado pelo método de difusão em disco de papel, em placas de Petri contendo meio de Mueller-Hinton (MH), semeadas com suspensões bacterianas de 3 cepas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Os resultados revelaram que o óleo essencial de *B. dracunculifolia* apresentou atividade antimicrobiana sobre *S. aureus*, *E. coli* e baixa atividade inibitória sobre *P. aeruginosa*.

No estudo de GALVÃO *et al.* (2012) constatou-se a eficácia desse óleo sobre cepas de *Streptococcus mutans*. Os resultados indicaram que o óleo essencial de alecrim-do-campo apresentou atividade bactericida em concentrações baixas, sendo considerado um possível agente a ser incorporado em formulações destinadas a redução de biofilme dental. FONSECA *et al.* (2012) avaliaram a atividade antifúngica do extrato e do óleo essencial de *B. dracunculifolia* e verificaram que o crescimento

de *Fusarium oxysporum* foi reduzido significativamente a partir de 500 µL/mL de extrato aquoso e a partir de 250 µL/mL de óleo de alecrim do campo.

2.3. Composição química dos extratos e do óleo essencial de *B. dracunculifolia*

As pesquisas em extração do óleo essencial de alecrim-do-campo mostram o isolamento de sesquiterpenos, flavonoides (flavona e flavanona), clerodanos e labdanos, embora também se tenha observado com certa frequência a presença de kauranos, monoterpenos, diterpenos e triterpenos, saponinas, glicolipídios, ácidos cumáricos, germacreno, tricotecenos, e fenilpropanóides (VERDI, 2005; FERRONATTO *et al*, 2007; SANTOS *et al*, 2012). Porém os sesquiterpenos oxigenados espatulenol, *trans*-nerolidol e *E*-nerolidol se encontraram como constituintes majoritários. O *E*-nerolidol por sua vez, foi aprovado nos Estados Unidos da América pela agência reguladora *Food and Drug Administration* (FDA) como um agente flavorizante utilizado em alimentos. O componente espatulenol apresenta atividade biológica importante com propriedades antibacterianas e moderada atividade citotóxica (SANTOS *et al*, 2012; RIGOTTI, 2011).

Análises cromatográficas com o óleo essencial de *B. dracunculifolia* isolaram 28 compostos, dentre eles os que mais se destacam são: *trans*-nerolidol, *cis*- β -guaieno, germacreno-D, *trans*-cariofileno, limoneno, α -pineno, β -mirceno, delta-cadineno, β -pineno e espatulenol (RIGOTTI, 2011; SANTOS *et al*, 2012).

O estudo de Chagas (2013) mostrou importante atividade anti-inflamatória dos extratos de acetato de etila obtidos de partes aéreas da espécie *Baccharis dracunculifolia*. A padronização do acetato de etila em ácidos fenólicos como ácidos cafeico, *p*-cumarico, drupanina, artepilina e bacarina apresentaram importante atividade contra inflamações intestinais, através do mecanismo de inibição da fosfatase alcalina e mieloperoxidase, reduzindo a infiltração de neutrófilos, além de atuar inibindo a peroxidação lipídica e impedirem a redução de glutathione, um sequestrador endógeno de radicais livres.

2.4. A busca por novos compostos antimicrobianos

O problema da resistência a antimicrobianos em populações bacterianas tem se agravado muito nos últimos anos, especialmente nas infecções de origem

hospitalar e os fármacos que antes se mostravam eficazes na rotina clínica tem perdido sua eficácia contra a maioria das cepas isoladas (FERRONATO *et al.*, 2007). A questão da resistência bacteriana aos antibióticos torna urgente a busca por novos compostos bioativos que representem novas possibilidades de aplicação antimicrobiana (PEREIRA *et al.*, 2004).

A resistência antimicrobiana e a sua disseminação entre bactérias é geralmente consequência da pressão seletiva dos antibióticos. As bactérias resistentes são transmitidas entre doentes e os fatores de resistência são transferidos entre bactérias sendo, em ambas as situações, mais frequentes em instituições de saúde. O uso contínuo de antimicrobianos aumenta a pressão seletiva, favorecendo a emergência, multiplicação e disseminação de bactérias resistentes. O uso inadequado e não controlado de agentes antimicrobianos, incluindo a prescrição excessiva, administração de doses sub-terapêuticas, duração insuficiente de tratamento e erros de diagnóstico levando à escolha incorreta de fármacos, contribuem para esta situação (JACOBY *et al.*, 2010; MAULDIN *et al.*, 2010).

Plantas com propriedades antimicrobianas combatem infecções com sucesso, e quando usadas em conjunto com medicamentos antimicrobianos, a estratégia do sinergismo é adotada, um mecanismo onde dois diferentes compostos são combinados para aumentar suas atividades individuais. Essa estratégia tem servido de inspiração para as pesquisas voltadas a descoberta de compostos que tem como finalidade atuar nos mecanismos de resistência bacteriana, minimizando-os (HEMAISWARYA *et al.*, 2008).

No início de 2000, programas de descoberta de antibióticos a partir de fontes naturais foram retomados em algumas indústrias farmacêuticas (GUIMARÃES *et al.*, 2010). Por este motivo, atualmente várias pesquisas atuam nas áreas de produtos naturais, explorando possíveis alternativas no tratamento de infecções causadas por microrganismos resistentes aos antibióticos disponíveis. As espécies vegetais do bioma Cerrado, por apresentarem em sua composição variados constituintes metabólitos secundários, são apontadas como excelentes alvos de escolha por sua potencial atividade biológica e de inibição microbiana (SILVA, 2013). Com isso, o presente estudo visa avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim-do-campo frente à duas cepas bacterianas, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

2.5. *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família Micrococcaceae, são bactérias Gram positivas, imóveis, agrupadas em massas irregulares ou cachos de uva, anaeróbias facultativas e catalase positivas. Os *Staphylococcus aureus* são coagulase positivos, beta-hemolíticos e fermentadores de manitol. Apesar de serem classificados como microrganismos mesófilos, demonstram crescimento em temperaturas entre 7,0 e 47,8°C (TORTORA *et al.*, 2005).

Staphylococcus aureus é um importante agente etiológico de diversas infecções. Cerca de 30-40% da população humana porta *S. aureus* na orofaringe e na pele, este patógeno pode produzir infecções oportunistas em pacientes sob situações de risco, como no caso de internações hospitalares, procedimentos invasivos e imunossupressão. Nestes casos, esta bactéria pode causar diferentes processos infecciosos, desde uma infecção cutânea até uma infecção sistêmica grave (TORTORA *et al.*, 2005).

A partir da década de 70, o *S. aureus* passou a ser um patógeno emergente nas infecções hospitalares, pois as cepas isoladas apresentavam resistência aos antibióticos β -lactâmicos (TOHIDPOUR *et al.*, 2010). As cepas com este perfil de resistência foram denominadas de MRSA (*Methicillin Resistance Staphylococcus aureus*). Houve rápida disseminação das cepas MRSA nos ambientes hospitalares e estas se apresentaram sensível apenas aos glicopeptídeos vancomicina e teicoplanina, que são nefrotóxicos (ZUO *et al.*, 2008). Nos últimos 10 anos, as cepas de MRSA, que eram restritas ao ambiente hospitalar, passaram a ser isoladas em pacientes com infecção de pele na comunidade, sem relato de internação nos últimos meses. Esta nova cepa foi denominada de *Community-associated MRSA* (CA-MRSA) (BENOIT *et al.*, 2008).

2.6. *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é membro da ordem *Enterobacteriales*, é um bacilo gram-negativo, anaeróbio facultativo, fermentador de lactose, componente comum da microbiota intestinal. Algumas linhagens podem ser patogênicas causando principalmente infecções urinárias, devido à proximidade com o órgão urinário, e gastroenterites, além de algumas cepas serem causa importante de síndrome

urêmica hemolítica. Atualmente linhagens de *E. coli* mostram resistência à ampicilina e ao cotrimoxazol (TORTORA *et al.*, 2005; SPICER, 2002).

Grupos patogênicos de *E. coli* são causas frequentes de diarreia do viajante, são as *enterotoxigênicas*, que causam uma diarreia aquosa, semelhante à uma cólera leve. Já as *enteroinvasivas*, invadem a parede intestinal resultando em inflamação, febre e disenteria. *E. coli* de certas linhagens também são um dos principais agentes etiológicos de infecções do trato urinário, causando desde infecções leves até pielonefrites, sendo o agente causal em cerca de 75% dos casos (TORTORA *et al.*, 2005).

No ambiente hospitalar, *E. coli* é um dos microrganismos envolvidos em sepse por gram-negativos e em choque induzido por endotoxinas. Além de ser comum em infecções graves do sistema urinário e em feridas, pneumonias em pacientes imunossuprimidos e meningite em recém-nascidos (WASHINGTON JR *et al.*, 2008).

3. JUSTIFICATIVA

Diversas cepas bacterianas se mostram resistentes aos antimicrobianos convencionais, com isso torna-se um desafio a busca por novos compostos antimicrobianos. As espécies vegetais do bioma Cerrado, por apresentarem em sua composição variados constituintes metabólitos secundários, são apontadas como excelentes alvos de busca por sua potencial atividade biológica e de inibição microbiana.

As pesquisas com o óleo de alecrim-do-campo mostram-se promissoras pois estudos realizados demonstraram potencial antimicrobiano em geral e anti-inflamatório. Com base nisso, o presente estudo visa avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* de óleo essencial de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) coletado na região do DF.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* de óleo essencial de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*), coletado na região do Distrito Federal, frente às bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Escherichia coli* ATCC 25922.

4.2. Objetivos específicos

- Produzir o óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia*;
- Testar capacidade antimicrobiana do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia*;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos de *Baccharis dracunculifolia* frente às cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Escherichia coli* ATCC 25922.

5. METODOLOGIA

5.1. Produção do óleo essencial

As amostras de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) foram identificadas e coletadas com a colaboração do Professor Botânico Dr. Christopher William Fagg da Universidade de Brasília. A espécie foi coletada no mês de agosto de 2018, na Fazenda Água Limpa da Universidade de Brasília (FAL/UnB), localizada no Park Way, Distrito Federal, Brasil.

Figura 1. Arbusto de *Baccharis dracunculifolia* na Fazenda Água Limpa, UNB.



Fonte: Autoria própria.

Com a colaboração da Professora Dr^a. Daniela Orsi da Universidade de Brasília, foram iniciados os trabalhos de extração do óleo essencial de alecrim-do-campo, no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ceilândia. As folhas coletadas foram lavadas com água corrente e em seguida o material foi seco em temperatura ambiente.

Figura 2. Folhas de *B. dracunculifolia* limpas e dispostas para secagem.



Fonte: Autoria própria.

O óleo essencial foi obtido por meio de hidrodestilação por arraste a vapor em aparelho tipo Clevenger, pelo período de 2-3 horas. Foram utilizadas 50 g de planta seca para cada 700 mL de água destilada, trituradas por 1 minuto em liquidificador. Foram realizadas 16 destilações, utilizando-se o total de 800 g de folhas secas de alecrim-do-campo para se obter 6 mL de óleo essencial, necessários para os testes de atividade antimicrobiana. O óleo foi recolhido do aparelho tipo Clevenger para um béquer pequeno com pipeta de Pasteur e transferido para tubos Eppendorf de 1,5 mL. Os tubos foram centrifugados para que houvesse a separação de fases entre o óleo e a água, após isso o óleo puro foi transferido para novos tubos eppendorf.

Figura 3. Processo de hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger.



Fonte: Autoria própria.

5.2. Microrganismos avaliados

Foram selecionadas 2 cepas de bactérias: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Escherichia coli* ATCC 25922. As cepas utilizadas foram cedidas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), da Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ.

5.3. Determinação da Concentração Inibitória mínima (CIM) pelo Método de Microdiluição em Caldo

O Método de Microdiluição em Caldo foi realizado de acordo com a descrição da *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), 2003. Os inóculos foram preparados com o crescimento das cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Escherichia coli* ATCC 25922 incubadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI). A concentração foi ajustada pela turbidez de 0,5 na escala de Mcfarland, apresentando aproximadamente 1×10^8 UFC/mL. Foram realizadas diluições das culturas em caldo Mueller Hinton (caldo MH), com auxílio espectrofotômetro de densidade óptica a 625nm resultando em uma concentração final de 1×10^5 UFC/mL.

Os ensaios foram realizados em microplacas de ELISA, de fundo chato, em triplicata contra as duas cepas de bactérias, nas concentrações de 30% e 20%. As placas são compostas de 96 poços, cada um identificado por números (colunas) e letras (fileiras). Nos poços de 1A a 1G, foram colocados 200 µL de óleo essencial ajustados às concentrações definidas, no restante dos poços foi colocado 100 µL de caldo MH, dando início à microdiluição. Após isso foi adicionado 80µL de caldo mais 20µL do inóculo, ajustado para a concentração final de 1×10^4 UFC/mL, por poço, com exceção da fileira D para evitar interferência de coloração dos extratos e do caldo MH. Foi utilizado como branco da placa, sendo 100 µL de caldo MH e 100 µL de óleo essencial ajustados às concentrações definidas; nos poços de 1H a 4H foram colocados 180 µL de caldo MH juntamente com 20 µL do inoculo (controle positivo); e nos poços 9H a 12H foi colocado o caldo puro (controle negativo). Cada poço apresentou um volume final de 200µL.

Esse método permite a detecção da Concentração Inibitória Mínima (CIM) que representa a menor concentração do óleo capaz de inibir o crescimento bacteriano.

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37° C por 24 horas e o procedimento foi feito em triplicata. A leitura das placas foi realizada em leitora de microplaca Multiskan, com comprimento de onda de 630 nm.

Os dados da leitura de absorbância obtidos, foram calculados através da formula seguinte, indicando a porcentagem e inibição alcançada:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{(DO \text{ obtida} - DO \text{ contr. Negativo})}{(DO \text{ contr. positivo} - DO \text{ contr. negativo})} \times 100$$

5.4. Viabilidade celular com Resazurina

Alternativamente a leitura da viabilidade celular foi feita com o reagente Resazurina sódica 0,01% como método colorimétrico. Foi obtida da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), e armazenada a 4 °C protegido da luz. Age como indicador de oxirredução, sendo reduzido (pelo ganho de hidrogênio) por flavinas ligadas a enzimas relacionadas com o sistema de transporte durante o metabolismo celular (RIBEIRO, 2004). O reagente foi adicionado às placas após a leitura pela leitora de microplaca Multiskan. Onde via-se a coloração roxa havia inibição do crescimento bacteriano, onde via-se rosa as bactérias não tinham sido inibidas.

5.5. Análise estatística

Foram executadas a análise da repetibilidade dos dados pelo cálculo do Intervalo de Correlação Intraclassa a 95% e cálculos de IC50 foram executados pela metodologia do ajuste à curva de dose resposta-sigmoidal. Os programas estatísticos utilizados foram o SPSS versão 22.0 e o GraphPadprism versão 7.0. O nível de significância adotado foi de 5%.

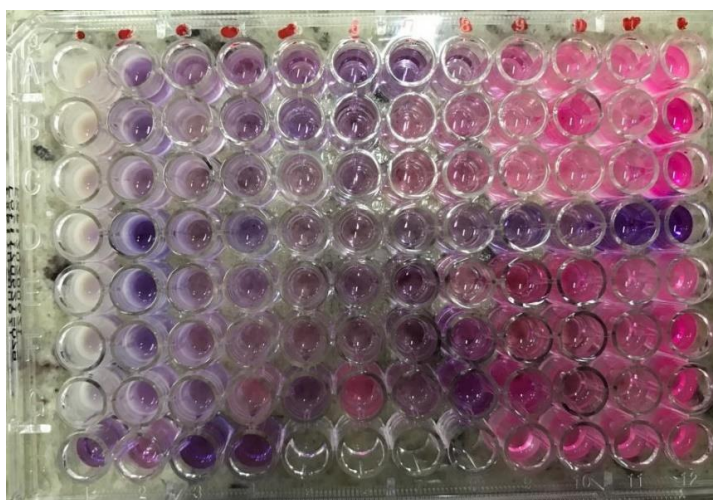
6. RESULTADOS

6.1. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* pelo método de microdiluição em caldo

No método de microdiluição em caldo, o óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* apresenta atividade antimicrobiana. Os valores de inibição do crescimento bacteriano foram obtidos por leitura em leitora de microplaca Multiskan (Figuras 4 e 5).

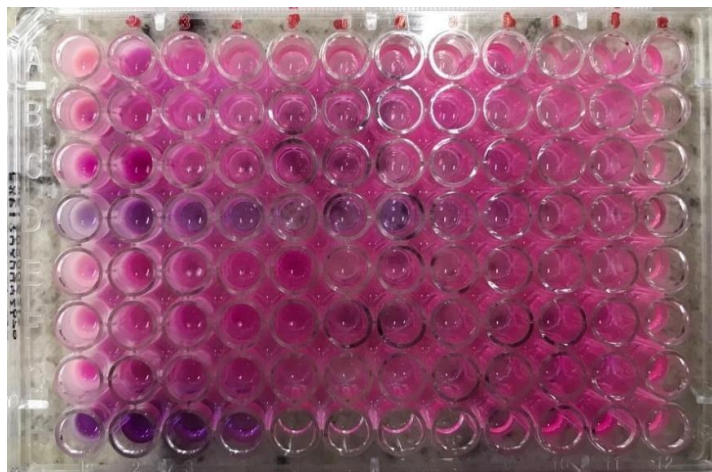
As figuras 4 e 5 mostram a inibição das bactérias testadas. Passadas as 24 horas de crescimento bacteriano, as placas foram coradas com corante Resazurina 0,01%, para melhor visualização da inibição gerada pelo óleo essencial. O que é visto em coloração roxa/lilás demonstra a ação do óleo de alecrim-do-campo obtendo melhor inibição do crescimento das cepas. Já onde as bactérias continuaram a crescer é visto na coloração rosa.

Figura 4. Método de microdiluição em caldo utilizando o óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* frente à bactéria *Staphylococcus aureus*. Os poços das duas colunas iniciais da placa (A e B) foram excluídos do cálculo de IC50, devido a elevada turbidez.



Fonte: Autoria própria.

Figura 5. Método de microdiluição em caldo utilizando o óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* frente à bactéria *Escherichia coli*. Os poços das duas colunas iniciais da placa (A e B) foram excluídos do cálculo de IC50, devido a elevada turbidez.



Fonte: Autoria própria.

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* foi avaliada como é mostrado na tabela 1. Com esses resultados foi assim determinada a CIM, frente aos microrganismos testados com o método extrativo utilizado.

Conforme indicado na tabela 1, percebeu-se que a CIM para inibição do microrganismo *Staphylococcus aureus* foi menor quando comparado ao da *Escherichia coli*.

Tabela 1. IC50, com intervalo de confiança a 95% e IC 99.9 (MBC) obtida após o método de microdiluição em caldo.

	Óleo essencial	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
IC 50 (CIM %)	0,020	0,025
IC 95% (IC 50)	0,017 a 0,024	0,015 a 0,046
IC 99,9 (MBC)	19,980	25,974

IC50: 50% da concentração inibitória máxima

IC95%: Intervalo de confiança a 95%

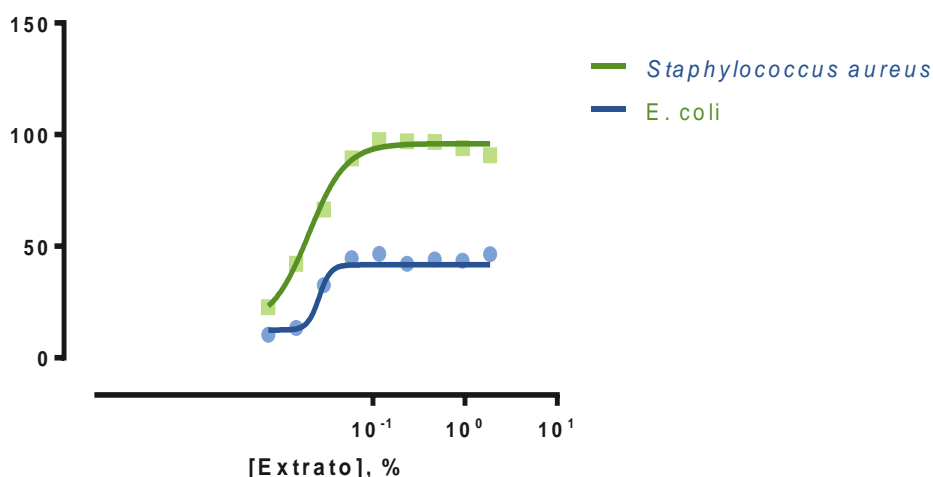
MBC: Concentração que resulta na morte bacteriana

Na tabela 1, existem três parâmetros importantes para serem analisados, o primeiro parâmetro (IC 50) trata-se de concentrações inibitórias das cepas de *S.aureus* e *E. coli*. O segundo parâmetro é referente ao intervalo de confiança para

a concentração inibitória (IC95%), que pode variar de 0,017 a 0,024 para a bactéria Gram positiva (*S. aureus*) e de 0,015 a 0,046 para a Gram negativa (*E. coli*), e que portanto, mesmo para *Staphylococcus aureus* temos um menor valor para IC 50, mas esta diferença não é significativa. E o último parâmetro é a concentração que resulta na morte bacteriana (MBC), foram obtidos resultados equivalentes à 19,980 e 25,974 para *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente.

Os resultados da CIM das atividades antibacterianas mostram que o óleo essencial é capaz de inibir o crescimento dos microrganismos testados, apresentando CIM de 0,025% para *Escherichia coli*, porém foi visto melhor resultado para *Staphylococcus aureus*, com a CIM de 0,020%.

Gráfico 1. O efeito de concentrações crescentes do extrato de *Baccharis dracunculifolia* in vitro sobre *S. aureus* e *E. coli*.



Fonte: Gráfico gerado pelo programa estatístico GraphPadprism

Legenda: Linha verde – *S. aureus*; linha azul – *E. coli*

O gráfico 1 representa o crescimento bacteriano das cepas testadas. Considerando os resultados, é visto que concentrações muito altas de extrato acabam resultando em uma CIM muito maior, quando comparado com uma concentração menor de extrato. Ou seja, concentrações muito altas não trazem bons resultados experimentais, uma vez que para o *S. aureus* foi possível obter um CIM mais baixo quando comparado à *E. coli*.

Com isto foi possível identificar que a mesma concentração de óleo utilizada, pode resultar em diferentes ações sobre as cepas ATCC. Concentrações muito altas tornam difícil a avaliação dos resultados experimentais, visto que o óleo quando

misturado ao caldo MH forma uma solução leitosa de elevada turbidez, dificultando a leitura, fornecendo então resultados errôneos.

7. DISCUSSÃO

O atual cenário de resistência bacteriana requer novas alternativas para redução do problema, ou seja, a busca por novos fármacos, sejam naturais ou sintéticos, para o tratamento de infecções principalmente quando se tratam de indivíduos imunocomprometidos, deve ser contínua (BERTINI *et al*, 2005). As plantas são uma ótima alternativa para pesquisas de novos compostos, já que possuem grande emprego popular, com isso o uso de produtos naturais para síntese de novos compostos pela indústria farmacêutica torna-se crescente (BERTINI *et al*, 2005; ROZATTO, 2012).

O óleo de alecrim-do-campo tem sido inspiração para muitas pesquisas, dadas as significativas propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias, cicatrizantes, anestésica, anti-*Trypanosoma cruzi*, anticariogênica, antiviral, anticarcinogênica e antioxidante (SOARES *et al*, 2015). Mesmo com todas essas atividades terapêuticas, devem ser realizados mais estudos para examinar individualmente cada ativo, determinando se as ações antimicrobianas são provenientes dos componentes isolados ou sincronizados (SILVA, 2013; VERDI *et al*, 2005; FERRONATTO *et al*, 2007). Segundo Verdi *et al*. (2005), alguns terpenos possuem atividade antimicrobiana, e seu estudo revela que o componente está presente no alecrim-do-campo. Segundo o estudo de Soares *et al* (2005), foi possível observar inibição bacteriana pelo composto nerolidol presente no óleo essencial de *B. dracunculifolia* sobre as cepas testadas em seu trabalho.

Em análise dos resultados obtidos neste trabalho, foi possível identificar que o óleo essencial obtido das folhas de *B. dracunculifolia* possui potencial antimicrobiano em bactérias Gram positivas e Gram negativas.

No trabalho de Piantino (2008) foi estudada a extração de compostos fenólicos de alecrim-do-campo com dióxido de carbono supercrítico. Na atividade antimicrobiana realizada por difusão de disco dentre os microrganismos testados (*S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*) apenas o *S. aureus* apresentou inibição do crescimento. Os extratos supercríticos e alcoólicos não apresentaram atividade frente a *C. albicans* e *E. coli*.

Ferronato *et al* (2007) fez um estudo com óleo essencial de duas espécies de *Baccharis*, a *B. dracunculifolia* e *B. uncinella*, ambos foram extraídos pelo processo de hidrodestilação e o método de avaliação foi difusão em disco de papel. Os

resultados apresentados em seu estudo mostraram atividade antibacteriana sobre *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*.

O resultado do presente estudo corrobora com o estudo de Ferronato *et al* (2007), obtendo inibição tanto para *S. aureus* quanto para *E. coli*, diferindo o local de colheita da planta e o período do ano. E que a inibição bacteriana utilizando óleo essencial obtido por processo de hidrodestilação por Clevenger mostra melhores resultados quando comparado com extratos alcoólicos como visto no estudo de Piantino (2008), para obtenção de produtos com a potencial atividade antibacteriana. No entanto é digno de nota: que o teste avaliado por Ferronato *et al* (2007) foi diferente da metodologia do presente estudo, visto que no estudo anteriormente citado, foi realizado método de difusão em disco de papel.

O estudo de Canton e Onofre (2010) avaliou extratos hidroalcoólicos de *B. dracunculifolia*, pelo método de difusão em disco em ágar MH contendo inóculos de *E. coli* e *S. aureus*. Os extratos foram produzidos da seguinte forma, 30g da planta seca foi triturada e misturada a 100 mL de etanol 70%, foi concentrado em capela de exaustão e foram obtidas duas frações do extrato, uma polar e outra apolar. Placas de Petri com os inóculos foram incubadas juntamente com os discos de papel impregnados com os extratos. Os resultados avaliados mostraram atividade em ambos os extratos, apresentando uma CIM de 25 e 6,25% para *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente com o extrato polar e de 25% para *S. aureus* com o extrato apolar. A *E. coli* mostrou-se resistente à ação dos componentes do extrato apolar.

Na literatura não há uma classificação consensual sobre os valores de CIM. Aligiannis e colaboradores (2001) apresentaram a seguinte classificação: CIM até 0,5mg/mL são inibidores potentes; CIM entre 0,6 e 1,5mg/mL são inibidores moderados; CIM acima de 1,6mg/mL são inibidores fracos. Enquanto Webster e colaboradores (2008) propuseram um valor de CIM satisfatório entre 1000µg/mL (1mg/mL) ou menos. Os resultados deste trabalho não foram obtidos na mesma unidade de medida (p/v), mas em % de extrato, porém, foi alcançado o IC50 para diluição 1500x menor da concentração utilizada no primeiro teste (30%). Outros resultados obtidos no mesmo laboratório, como teste em inibição por difusão em disco de papel em ágar corroboraram no sentido que o extrato inibe o crescimento bacteriano (dados não mostrados).

No presente estudo também foi observado que as cepas de *S. aureus* são sensíveis à baixas concentrações do óleo essencial, e as cepas de *E. coli* foram

inibidas em maiores concentrações, mesmo apresentando intervalos de confiança coincidentes.

No estudo de Soares *et al* (2005) foram observados resultados parecidos com este estudo, na qual as cepas de *S. aureus* e de *S. Pyogenes* apresentaram-se sensíveis à quaisquer concentrações dos extratos de *B. dracunculifolia*, testadas. Quanto às Gram negativas, só houve inibição a partir de 15% de concentração do extrato, demonstrando melhor ação sobre bactérias Gram positivas. Essa diferença de resultados pode ser devido a distinção na estrutura da parede bacteriana em relação as Gram negativas. Relata ainda em seu estudo que há a necessidade de maiores pesquisas com o óleo essencial de *B. dracunculifolia*, abrangendo outras espécies de microrganismos tanto Gram positivos quanto Gram negativos, para determinar o potencial antibacteriano da espécie *B. dracunculifolia*.

Embora a parede das bactérias Gram positivas seja um obstáculo para a ação de diversos medicamentos antibacterianos, o óleo essencial de alecrim-do-campo demonstra eficiência sobre as mesmas como agente antimicrobiano (SOARES *et al*, 2015).

8. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, utilizando o método de microdiluição em caldo, o óleo essencial obtido de *B. dracunculifolia*, quando avaliados sobre as cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Escherichia coli* ATCC 25922, mostra-se eficiente em inibir o crescimento dos microrganismos testados. Com os resultados obtidos, podemos sugerir que estudos posteriores sejam realizados buscando caracterizar quimicamente o óleo estudado e posteriormente identificar os componentes e quais grupamentos químicos apresentam essa atividade sobre as bactérias testadas.

Além disso, como perspectiva futura é possível estudar os efeitos desse extrato em células de mamíferos para o estudo de demais efeitos, incluindo o potencial antitumoral observado em outros extratos vegetais.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIGIANNIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of five taxa of *Sideritis* from Greece. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 2, p. 811-815, 2001.

BELINI, Camila Moreira Batista. *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae): composição do óleo essencial, diversidade e parâmetros genéticos. 2015.

BENOIT, S. R. Community strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* as potential cause of healthcare-associated infections, Uruguay, 2002-2004. **Emerging Infectious Diseases**. v.14, n.8. p. 1216-1222, 2008.

BERNARDES, C.T.V. Avaliação das atividades antimicrobiana, antisséptica e esterilizante de extratos e metabólitos de *Baccharis dracunculifolia* DC e *Pinus elliottii* Engelm. 2014. 167p Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, 2014.

BERTINI, Luciana Medeiros *et al.* Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, v. 17, n. 3-4, p. 80-83, 2005.

CANTON, Marilde; ONOFRE, Sideney Becker. Interference from extracts of *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae, on the activity of antibiotics used in the clinic. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 348-354, 2010.

CHAGAS, Alexandre da Silveira. Efeitos do extrato de *Baccharis dracunculifolia* DC em diferentes mediadores da inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos. 2013.

FERRONATTO, Regina *et al.* Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* DC e *Baccharis uncinella* DC (Asteraceae). **Rev bras farmacogn**, v. 17, p. 224-230, 2007.

FLORÃO, Angela. Avaliação de atividades biológicas de óleos essenciais de quatro espécies de *Baccharis*, Asteraceae. 2006.

FONSECA, M. C. M. *et al.* Atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos vegetais sobre fungos fitopatogênicos. **Horticultura Brasileira**, v. 30, p. S 6169- S 6176, 2012.

GALVÃO, Livia Câmara de Carvalho *et al.* Antimicrobial activity of essential oils against *Streptococcus mutans* and their antiproliferative effects. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. D. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A. K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**, v. 15, n. 8, p. 639-652, 2008.

JACOBY, T.S. ; KUCHENBECKER, R.S. ; DOS SANTOS, R.P. ; MAGEDANZ, L. ; GUZATTO, P. ; MOREIRA, L.B. Impact of hospital-wide infection rate, invasive procedures use and antimicrobial consumption on bacterial resistance inside an intensive care unit, **Journal of Hospital Infection**, v. 75, n. 1, p. 23 -27, 2009.

LEITÃO, D.P. *et al.* 2004. Comparative evaluation of in-vitro effects of Brazilian green propolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of *Streptococcus mutans*. **Biol. Pharm. Bull.** 27 (11):1834-9.

MAISANABA, S. *et al.* Toxicological evaluation of clay minerals and derived nanocomposites: A review. **Environmental Research**, v. 138, p. 233-254, 2015.

MAULDIN, P. D.; SALGADO, C. D.; HANSEN, I. S. J; DURUP, D. T.; BOSSO, J. A. Attributable hospital cost and length of stay associated with health care-associated

infections caused by antibiotic-resistant gram-negative bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p.109-115, 2010.

PEREIRA, Rogério Santos *et al.* Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, p. 326-328, 2004.

PIANTINO, C. R. **Extração de compostos fenólicos de alecrim-do-campo (*Bacchari dracunculifolia*) com dióxido de carbono supercrítico**, 99 p., Dissertação (Mestrado), UNICAMP, 2008.

PROBST, Isabella da Silva. Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico. 2012.

QUEIROZ, Neusa Santos. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto & Contexto Enfermagem**, v. 13, n. Esp, 2004.

RIBEIRO, Marta Osório et al. Avaliação de testes rápidos em microplacas usando indicadores de viabilidade celular para determinação da susceptibilidade de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* à isoniazida e rifampicina. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30, p. 4, 2004.

RIGOTTI, M.; *Baccharis dracunculifolia* DC: diversidade genética e química de populações. 2011.

ROZATTO, Mariana Rodrigues. **Determinação da atividade antimicrobiana in vitro de extratos, frações e compostos isolados de *Arrabidaea brachypoda***. 2012. 100 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2012.

SANTOS, R. F. *et al.* Composição química e produtividade dos principais componentes do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC. em função da adubação orgânica. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, p. 224-234, 2012.

SILVA, S. M. M. **Avaliação da atividade antimicrobiana de espécies vegetais do bioma Cerrado**. 2013. 113 f., Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

SOARES, Killarney Ataide *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana de extrato de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) sobre bactérias gram negativas e gram positivas. **Ensaio e Ciência: C. Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 17, n. 4, 2015.

SPICER, W. John. Bacteriologia, micologia e parasitologia clínicas. In: **Bacteriologia, micologia e parasitologia clínicas**. 2002.

TASCHETTO, Ana Paula Dambros. **Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos aquosos e etanólicos de baccharis trimera e baccharis articulata frente ao microorganismo helicobacter pylori**. 2010. Dissertação de Mestrado.

TOHIDPOUR, A. *et al.* Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Phytomedicine**, v. 17, n. 2, p. 142-145, 2010.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8ª. Porto Alegre. 2005.

VERDI, Luiz Gonzaga; BRIGHENTE, Inês Maria Costa; PIZZOLATTI, Moacir Geraldo. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.

WASHINGTON JR, Winn *et al.* Diagnostico microbiológico. **Sexta Edição, Koneman, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro**, 2008.

WEBSTER, Duncan *et al.* Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, n. 1, p. 140-146, 2008.

ZUO, G.; WANG, G.; ZHAO, Y.; XU, G.; HAO, X.; HAN, J.; ZHAO, Q. Screening of Chinese medicinal plants for inhibition against clinical isolates of methicillin-resistant

Staphylococcus aureus (MRSA). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 287-290, 2008.